

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

تعهدنامه‌ی اصالت اثر و رعایت حقوق دانشگاه

تمامی حقوق مادی و معنوی مترتب بر نتایج، ابتکارات، اختراعات و نوآوری‌های ناشی از انجام این پژوهش، متعلق به **دانشگاه محقق اردبیلی** می‌باشد. نقل مطلب از این اثر، با رعایت مقررات مربوطه و با ذکر نام دانشگاه محقق اردبیلی، نام استاد راهنما و دانشجو بلامانع است.

اینجانب **نسرین خوش لحنی** دانش‌آموخته‌ی مقطع کارشناسی ارشد رشته‌ی **زیست‌شناسی** گرایش **فیزیولوژی جانوری** دانشکده‌ی **علوم پایه** دانشگاه محقق اردبیلی به شماره‌ی دانشجویی **۹۲۲۲۵۰۳۲۰۱** که در تاریخ **۱۳۹۵/۶/۱۷** از پایان‌نامه‌ی تحصیلی خود تحت عنوان **تأثیر کاهش آهن بر توانایی زنده ماندن سلول‌های بنیادی مزانشیم مشتق از مغز استخوان موش صحرایی در برابر استرس اکسیداتیو** دفاع نموده‌ام، متعهد می‌شوم که:

- (۱) این پایان‌نامه را قبلاً برای دریافت هیچ‌گونه مدرک تحصیلی یا به عنوان هرگونه فعالیت پژوهشی در سایر دانشگاه‌ها و مؤسسات آموزشی و پژوهشی داخل و خارج از کشور ارائه ننموده‌ام.
- (۲) مسئولیت صحت و سقم تمامی مندرجات پایان‌نامه‌ی تحصیلی خود را بر عهده می‌گیرم.
- (۳) این پایان‌نامه، حاصل پژوهش انجام شده توسط اینجانب می‌باشد.
- (۴) در مواردی که از دستاوردهای علمی و پژوهشی دیگران استفاده نموده‌ام، مطابق ضوابط و مقررات مربوطه و با رعایت اصل امانتداری علمی، نام منبع مورد استفاده و سایر مشخصات آن را در متن و فهرست منابع و مأخذ ذکر نموده‌ام.
- (۵) چنانچه بعد از فراغت از تحصیل، قصد استفاده یا هرگونه بهره‌برداری اعم از نشر کتاب، ثبت اختراع و ... از این پایان‌نامه را داشته باشم، از حوزه‌ی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی، مجوزهای لازم را اخذ نمایم.
- (۶) در صورت ارائه‌ی مقاله‌ی مستخرج از این پایان‌نامه در همایش‌ها، کنفرانس‌ها، سمینارها، گردهمایی‌ها و انواع مجلات، نام دانشگاه محقق اردبیلی را در کنار نام نویسندگان (دانشجو و اساتید راهنما و مشاور) ذکر نمایم.
- (۷) چنانچه در هر مقطع زمانی، خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن (منجمله ابطال مدرک تحصیلی، طرح شکایت توسط دانشگاه و ...) را می‌پذیرم و دانشگاه محقق اردبیلی را مجاز می‌دانم با اینجانب مطابق ضوابط و مقررات مربوطه رفتار نماید.

نام و نام خانوادگی دانشجو: **نسرین خوش لحنی**

امضا

تاریخ



دانشکده‌ی علوم پایه

گروه آموزشی زیست‌شناسی

پایان‌نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد
در رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری

عنوان:

**تأثیر کاهش آهن بر توانایی زنده ماندن سلول‌های بنیادی مزانشیم مشتق از مغز
استخوان موش صحرایی در برابر استرس اکسیداتیو**

اساتید راهنما

دکتر طوبا میرزاپور

دکتر محسن سقا

اساتید مشاور

دکتر محمد محمدزاده

دکتر ابوالفضل بایرامی

دانشجو

نسرین خوش‌لحنی

تابستان ۱۳۹۵

تقدیم به:

پدرم

که هستیم و استواری قدم هایم از

اوست....

و

به پسر دتترم

که امتداد هستی و آرمان های من

است.....

تقدیم به شهدای راه اندیشه و

آزادی ، شهدای ایران و برادرم محمود

شکرانه :

سپاس خدای سبحان را که جسم بی مقدارمان را به گوهر حکمت شرافت بخشید.

اکنون به پایان راهی رسیده ام که یکی از بالارزش ترین آغازهای زندگیم بود و جانِ دلم رابه شعله ی معنابخش حکمت و معرفت نفسی تازه بخشید. شکرگزار خدای منان هستم که زندگیم را در سایه سارِ **پدر و مادری** هستی بخشید که عشق به الله و خرد و منطق سرلوحه ی سرتاسر زندگیشان است و این مقال، بالارزش ترین جایگاهی ست که بتوانم مراتب سپاس خود را به ایشان برسانم. مرهون همدلی ها و همراهی های **همسر** صبورم هستم که همواره وجودش گرما بخش زندگیم بوده است. سپاس از پاره های جانم **اسماء و محمد/امین** و همسرِ دخترم، **سعید** عزیز که با صبوری هایشان قوت قلبم شدند که اگر نبودند شاید هیچگاه طعمِ دلنشینِ سعادتِ این چنین را نمی چشیدم.

وامدار استاد یگانه ام **دکتر محسن سقا** هستم که اگر نبود راه گشایی هایشان حتی گامی کوچک برداشته نمی شد و استاد بی نظیرم **دکتر محمد محمدزاده** که چراغ دانش و معرفتش روشنی عقبات ظلمانی این سلوک شد.

از استادان بزرگوارم دکتر طوبا میرزاپور و دکتر ابوالفضل بایرامی بی نهایت ممنون و سپاسگزارم که در طی دشواری های این مسیر پرفراز و نشیب راهنمایم بوده اند.

سپاس ویژه دارم از مجموعه ی منسجم و متعهد آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول های بنیادی گروه علوم و تشریح و پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل که کلیه ی مراحل آزمایشی و عملی این پایان نامه تحت نظارت مستقیم و با همکاری این مجموعه انجام شده است.

از تمام کسانی که در این مسیر باعث دلگرمی بوده اند؛ خواهرانم بخصوص حکمت عزیزم که در همه ی لحظات ناب زندگیم همراه و یاورم بوده؛ برادر مهربانم؛ دوستان با وفایم خانم مولود جامعی و خانم لیلی معنوی که همیشه امیدبخش لحظات دشوار زندگی ام بوده اند و از همراهان مسیر پژوهشی ام به خصوص دکتر هاشم سیروس و خانم فرنوش سرایی و مریم سالم نهایت سپاس و امتنان را دارم.

در نهایت بر خود لازم می دانم از همکاری های شایسته و بجای خانم دکتر مهین نیکوگفتار در سازمان انتقال خون ایران و همچنین از استاد ارجمندم دکتر اسداله اسدی که زحمت داوری این پایان نامه را پذیرا شدند کمال تشکر را داشته باشم.

نام خانوادگی دانشجو: خوش لحنی	
عنوان پایان نامه:	
تأثیر کاهش آهن بر توانایی زنده ماندن سلول‌های بنیادی مزانشیم مشتق از مغز استخوان موش صحرایی در برابر استرس اکسیداتیو	
اساتید راهنما: دکتر طوبا میرزاپور - دکتر محسن سقا اساتید مشاور: دکتر محمد محمدزاده - دکتر ابوالفضل بیرامی	
مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد	رشته: زیست‌شناسی
گرایش: فیزیولوژی جانوری	دانشگاه: محقق اردبیلی
دانشکده: علوم پایه	تاریخ دفاع: ۱۳۹۵/۶/۱۷
تعداد صفحات: ۱۷۴ صفحه	
چکیده:	
<p>سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BM-MSCs) سلول‌هایی چندتوان و دارای توانایی تمایز می‌باشند که مانند همه سلول‌های بنیادی می‌توانند در تقسیم‌های مکرر ویژگی خودنوسازی خود را حفظ کنند. به همین دلیل این سلول‌ها را می‌توان با شرایط خاص کشت، به سلول‌هایی با عملکردهای تخصص یافته تبدیل نمود و از آنها برای اهداف سلول درمانی استفاده کرد. این سلول‌ها قابلیت تمایز به رده‌های سلولی چربی، استخوان و غضروف را دارد. همچنین می‌توان از این سلول‌ها برای افزایش میزان عملکرد میوکاردی که دچار انفارکتوس شده و یا برای جایگزینی با سلول‌های آسیب دیده‌ی انسولین ساز پانکراسی در بیماران دیابتی، استفاده کرد. تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که حدود ۹۹٪ این سلول‌ها پس از پیوند از بین می‌روند و عملاً روند پیوند را با محدودیت زیادی مواجه می‌کنند. این پژوهش در راستای افزایش میزان بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در مواجهه با ریزمحیط‌های استرس‌زایی که سلول در مراحل پیوند با آن برخورد می‌کند صورت گرفته است. از آنجا که یکی از مهمترین استرس‌های وارده به سلول‌های پیوندی استرس اکسیداتیو می‌باشد، به نظر می‌رسد هر استراتژی که منجر به افزایش بقای سلول‌ها گردد می‌تواند مهم و بارز باشد. در این راستا یکی از استراتژی‌های موفق مقاوم نمودن سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو قبل از پیوند می‌باشد که در این تحقیق افزایش بقا از طریق کاهش آهن در دسترس سلول، توسط حذف کننده موثر آن، دفروکسامین (DFO) مورد آزمایش قرار گرفته است. برای این منظور ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از مغز استخوان موش صحرایی استخراج و کشت داده شد و سپس توانایی زنده ماندن آنها را در برابر استرس اکسیداتیو مورد ارزیابی قرار گرفت و این میزان توانایی با سلول‌هایی که توسط DFO پیش تیمار شده بودند مقایسه گردید. نتایج حاصل نشان داد که توانایی زنده ماندن سلول‌هایی که با کاهش آهن پیش تیمار شده‌اند در مواجهه با استرس اکسیداتیو، در یک شرایط وابسته به غلظت DFO و مدت زمان تیمار، به طور قابل ملاحظه و معناداری افزایش یافت.</p>	
کلید واژه‌ها: آپوپتوز، آهن، استرس اکسیداتیو، توانایی زنده ماندن، سلول‌های بنیادی مزانشیم.	

شماره و عنوان مطالب	صفحه
---------------------	------

فصل اول: کلیات پژوهش

۱-۱ سلول‌های بنیادی.....	۲
۱-۱-۱ خواص سلول‌های بنیادی.....	۳
۱-۱-۱-۱ خودنوسازی در سلول‌های بنیادی.....	۴
۱-۱-۱-۲ تمایز در سلول‌های بنیادی.....	۴
۱-۱-۱-۳ انعطاف پذیری در سلول‌های بنیادی.....	۵
۱-۱-۱-۴ انواع سلول‌های بنیادی براساس منشأ سلول‌ها.....	۶
۱-۱-۱-۴-۱ سلول‌های بنیادی رویانی.....	۶
۱-۱-۱-۴-۲ سلول‌های بنیادی بزرگسالان.....	۶
۱-۲ سلول‌های بنیادی مزانشیمی.....	۸
۱-۲-۱ تاریخچه ی کشف و جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی.....	۸
۱-۲-۲ خواص سلول‌های بنیادی مزانشیمی.....	۹
۳-۱ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان.....	۱۰
۱-۳-۱ کنام سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان.....	۱۱
۱-۳-۲ اثرات MSC ها بر سایر سلول‌های مغز استخوان.....	۱۳
۱-۴ کاربرد سلول‌های بنیادی.....	۱۴
۱-۴-۱ استفاده از سلول‌های بنیادی در تحقیقات.....	۱۴
۱-۴-۲ استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان (سلول درمانی).....	۱۵
۱-۴-۲-۱ استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم بافت.....	۱۵
۱-۴-۲-۴-۱ سلول‌های بنیادی و ترمیم بافت کبدی.....	۱۶
۱-۴-۲-۴-۱ سلول‌های بنیادی و درمان دیابت.....	۱۷
۱-۴-۲-۴-۱ سلول‌های بنیادی و درمان ضایعات نخاعی.....	۱۹
۱-۴-۲-۴-۱ سلول‌های بنیادی و درمان انفارکتوس.....	۲۱
۴-۳-۱ سلول‌های بنیادی و ژن درمانی.....	۲۳
۵-۱ مشکلات استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در کاربردهای درمانی.....	۲۴
۱-۵-۱ مشکلات استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BM-MSCs).....	۲۵
۵-۲-۱ حفظ بنیادینگی.....	۲۶
۵-۳-۱ مرگ MSC های پیوند شده.....	۲۷
۵-۳-۱ انواع مرگ و آسیب سلولی.....	۲۷
۱-۵-۳-۱-۱ نکروز.....	۲۸

۲۸ اتوفازی ۱-۵-۳-۱-۲
۳۰ آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده) ۱-۵-۳-۱-۳
۳۰ برخی از پروتئین های دخیل در فرآیند آپوپتوز ۱-۵-۳-۱-۳-۱
۳۰ خانواده ی $Bcl2$ ۱-۵-۳-۱-۳-۱-۱
۳۲ انواع کسپازها ۱-۵-۳-۱-۳-۱-۲
۳۲ مسیرهای درگیر در تحریک فرآیند آپوپتوز ۱-۵-۳-۱-۳-۲
۳۳ مسیر درونی آپوپتوز (مسیر میتوکندریایی) ۱-۵-۳-۱-۳-۲-۱
۳۴ مسیر بیرونی آپوپتوز (مسیر گیرنده ای) ۱-۵-۳-۱-۳-۲-۲
۳۸ عوامل مؤثر در مرگ MSC ها پس از پیوند ۱-۵-۳-۲
۴۱ افزایش مقاومت MSC ها قبل از پیوند ۱-۵-۳-۳
۴۱ پیش شرطی سازی ۱-۵-۳-۳-۱
۴۱ پیش شرطی سازی با استرس اکسیداتیو ۱-۵-۳-۳-۱-۱
۴۲ پیش شرطی سازی با هیپوکسی ۱-۵-۳-۳-۱-۲
۴۳ پیش شرطی سازی با محرومیت از سرم ۱-۵-۳-۳-۱-۳
۴۴ پیش تیمار ۱-۵-۳-۳-۲
۴۵ دستکاری ژنتیکی ۱-۵-۳-۳-۳
۴۵ اصلاح شرایط کشت و ریز محیط ها ۱-۵-۳-۳-۴
۴۶ کشت غیر چسبنده با سوسپانسیون ۱-۵-۳-۳-۴-۱
۴۶ کشت بر روی داربست ها ۱-۵-۳-۳-۴-۲
۴۷ استفاده از محیط کشت فراهم شده یا (Secretome) ۱-۵-۳-۳-۴-۳
۴۸ هومئوستازی آهن ۱-۶
۴۹ متابولیسم آهن ۱-۶-۱
۴۹ مولکول هم (Heme) به عنوان یکی از ضروری ترین ترکیبات آهن دار ۱-۶-۱-۱
۵۲ جذب آهن از سلول های انتروسیت دئودنوم (دوازدهه) ۱-۶-۱-۲
۵۲ تنظیم آهن درون سلول ۱-۶-۱-۳
۵۳ سیستم انتقال آهن به بافت ها ۱-۶-۱-۴
۵۴ تنظیم سیستم ترابری آهن، نقش هورمون هپسیدین در هومئوستازی آهن ۱-۶-۱-۵
۵۵ بیماری های ناشی از اختلال در متابولیسم آهن ۱-۶-۲
۵۵ بیماری های ژنتیکی - هموکروماتوزیس ارثی (HH) ۱-۶-۲-۱
۵۶ کمبود آهن و آنمی ۱-۶-۲-۲
۵۷ آهن و سرطان ۱-۶-۲-۳
۵۸ آهن و ارتباط آن با التهاب ۱-۶-۲-۴
۵۹ نقش آهن در اختلالات قلبی و عروقی ۱-۶-۲-۵
۶۱ آهن ، پیری و اختلالات سیستم عصبی ۱-۶-۲-۶
۶۴ اثرات مضر اضافه باری آهن در سلول ها ۱-۶-۳

۶۴	۱-۶-۳-۱ اثرات توکسیک آهن آزاد درون سلولی
۶۶	۱-۶-۳-۲ حذف کننده ها و چگونگی عملکرد آن ها در کاهش اضافه باری آهن
۶۸	۱-۶-۳-۳ کاهش آهن در سلول سبب بروز هیپوکسی می شود
۷۰	۱-۶-۳-۴ اثرات هیپوکسی بر سلول ها
۷۱	۱-۶-۳-۴-۱ هیپوکسی و آپوپتوز
۷۲	۱-۶-۳-۴-۲ هیپوکسی و هومئوستازی آهن
۷۴	۱-۶-۳-۴-۳ هیپوکسی و اثرات مثبت آن بر خواص فیزیولوژیکی سلول ها
۷۵	۱-۷ هدف از این تحقیق

فصل دوم: مواد و روش ها

۸۱	۲-۱ مراحل کشت و گسترش BM-MSC
۸۱	۲-۱-۱ تهیه محلول های مورد نیاز برای کشت و آزمایش BM-MSC
۸۱	۲-۱-۱-۱ تهیه محلول بافر نمکی فسفات (PBS)
۸۲	۲-۱-۱-۲ تهیه محیط کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان
۸۲	۲-۱-۱-۳ روش تهیه محلول رنگ آمیزی MTT
۸۳	۲-۱-۱-۴ تهیه محلول هایی با غلظت های متفاوت از H_2O_2
۸۳	۲-۱-۱-۵ تهیه محلول هایی با غلظت های متفاوت از دفروکسامین (DFO)
۸۴	۲-۱-۱-۶ تهیه محلول رنگ آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید (AO/EB)
۸۶	۲-۱-۱-۷ تهیه محلول رنگ آمیزی DAPI
۸۷	۲-۱-۲ استخراج، کشت و گسترش BM-MSC
۸۷	۲-۱-۲-۱ جداسازی استخوان های ران و درشت نی
۸۸	۲-۱-۲-۲ استخراج سلول های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش صحرایی
۸۹	۲-۱-۲-۳ کشت اولیه BM-MSCs
۸۹	۲-۱-۲-۴ تعویض محیط کشت سلول ها
۹۰	۲-۱-۲-۵ پاساژ سلول ها
۹۱	۲-۱-۲-۶ استفاده از فرآیند انجماد در مسیر کشت و گسترش سلول ها
۹۱	۲-۱-۲-۶-۱ منجمد کردن سلول ها
۹۱	۲-۱-۲-۶-۲ باز گردانی سلول ها از انجماد
۹۲	۲-۲ آزمایش های تعیین هویت BM-MSC های مورد استفاده در پژوهش
۹۲	۲-۲-۱ تایید ماهیت بنیادی و مزانشیمی سلول های استخراج شده از مغز استخوان موش صحرایی با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری
۹۳	۲-۲-۲ تمایز BM-MSC به رده سلولی سلول های چربی
۹۳	۲-۳ آزمایش های مربوط به مقاوم سازی BM-MSCs
۹۳	۲-۳-۱ بررسی اثر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 بر توانایی زنده ماندن BM-MSCs با استفاده از تکنیک MTT

۲-۳-۱-۱	بررسی اثر تراکم BM-MSC های کشت شده بر توانایی زنده ماندن آن ها در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2	۹۴
۲-۳-۱-۲	تعیین دوز IC_{50} برای H_2O_2 با استفاده از تکنیک MTT	۹۴
۲-۳-۲	بررسی اثر DFO بر BM-MSCs	۹۵
۲-۳-۲-۱	بررسی توانایی زنده ماندن سلول ها در برابر غلظت های متفاوت DFO با استفاده از تکنیک MTT	۹۵
۲-۳-۳	بررسی اثر مقاومتی پیش تیمار سلول ها با DFO در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2	۹۶
۲-۴	بررسی های ریخت شناسی BM-MSC های مقاوم شده در برابر استرس اکسیداتیو	۹۷
۲-۴-۱	بررسی ریخت شناختی BM-MSCs با استفاده از تکنیک رنگ آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید (AO/EB)	۹۷
۲-۴-۲	بررسی مورفولوژیکی BM-MSCs با تکنیک رنگ آمیزی DAPI	۹۷
۲-۵	تست آپوپتوز	۹۸
۲-۵-۱	بررسی میزان آپوپتوز BM-MSCs مقاوم شده با استفاده از اندازه گیری میزان بیان پروتئین ۳ caspase	۹۸
۲-۶	آنالیز آماری	۹۹

فصل سوم: نتایج

۳-۱	کشت سلول های BM-MSCs	۱۰۱
۳-۲	ارزیابی نشانگرهای سطحی BM-MSC های مشتق از موش صحرایی	۱۰۲
۳-۲-۱	نتایج آنالیز فلوسایتومتری	۱۰۲
۳-۳	تمایز BM-MSC به رده ی سلولی آدیپوسیت (سلول های چربی)	۱۰۵
۳-۴	بررسی میزان مقاومت BM-MSCs در برابر H_2O_2	۱۰۶
۳-۴-۱	اثر تراکم سلول های کشت داده شده	۱۰۶
۳-۴-۲	تعیین IC_{50} برای BM-MSCs در برابر H_2O_2 با استفاده از تکنیک MTT	۱۰۹
۳-۵	تأثیر کاهش آهن بر توانایی زنده ماندن BM-MSCs	۱۱۱
۳-۶	مقاومت سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تیمار شده با غلظت های مختلف DFO نسبت به استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 تأثیر	۱۱۳
۳-۷	بررسی مورفولوژی BM-MSCs در روند مقاوم سازی آنها در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2	۱۱۵
۳-۷-۱	بررسی مورفولوژی BM-MSCs با تکنیک AO/EB	۱۱۵
۳-۷-۲	نتایج کمی حاصل از رنگ آمیزی سلول ها با تکنیک AO/EB	۱۱۷
۳-۷-۳	بررسی مورفولوژی BM-MSCs با تکنیک رنگ آمیزی DAPI در روند مقاوم سازی آنها در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2	۱۱۷
۳-۸	بررسی میزان آپوپتوز سلول های بنیادی مقاوم شده در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 با استفاده از میزان بیان ۳ caspase	۱۱۹

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱	استخراج و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی	۱۲۳
-----	---	-----

۴-۲	بررسی اثر تراکم سلول‌های کشت شده بر میزان مقاومت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2	۱۲۵
۴-۳	ارزیابی میزان مقاومت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در برابر غلظت‌های متفاوت H_2O_2	۱۲۶
۴-۴	راه‌های افزایش مقاومت سلول‌های بنیادی مزانشیمی.....	۱۲۹
۴-۵	بررسی موفقولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مقاوم شده در برابر استرس اکسیداتیو.....	۱۳۵
۴-۶	بررسی آپوپتوز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مقاوم شده در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2	۱۳۸
۴-۷	پیشنهادهای:.....	۱۴۱
	فهرست منابع.....	۱۴۲

فهرست جدول‌ها

شماره و عنوان جدول	صفحه
جدول ۱-۲ فهرست تجهیزات به کار رفته.....	۷۸
جدول ۲-۲ فهرست مواد شیمیایی مورد استفاده.....	۸۰
جدول ۳ - ۱ درصد بیان نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت منفرد و توأم.....	۱۰۴
جدول ۳ - ۲ میانگین و انحراف معیار درصد حیات BM-MSCs در گروه‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ سلولی در برابر غلظت‌های متفاوت از H_2O_2	۱۰۸
جدول ۳ - ۳ مقایسه بین گروهی اثر غلظت‌های مختلف H_2O_2 بر BM-MSCs.....	۱۱۰
جدول ۳ - ۴ مقایسه بین گروهی میزان حیات BM-MSC در برابر DFO.....	۱۱۲
جدول ۳ - ۵ مقایسه بین گروهی مقاومت BM-MSCs تیمار شده با غلظت‌های مختلف DFO در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2	۱۱۵
جدول ۳ - ۷ مقایسه میزان پروتئین فعال ۳ caspase بین گروه‌های آزمایشی BM-MSCs.....	۱۲۱

فهرست شکل‌ها

شماره و عنوان شکل	صفحه
شکل ۱-۱ طرح شماتیک از انواع سلول‌های بنیادی بر اساس توان تمایزی آنها.....	۵
شکل ۲-۱ برخی منابع سلول‌های بنیادی بزرگسال.....	۷
شکل ۳-۱ برخی منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی.....	۱۰
شکل ۴-۱ کلام سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان.....	۱۲
شکل ۵-۱ طرح شماتیک از اثرات پاراکراینی BM-MSCs در کلام های اندوستیال، استرومال و پری واسکولار	۱۳
شکل ۶-۱ طرح شماتیک اتوفازی در سلول.....	۳۰
شکل ۷-۱ خانواده ی پروتئینی Bcl-۲.....	۳۲
شکل ۸-۱ طرح شماتیک از ساختار آپوپتوزوم و ارتباط آن با ۹ caspase.....	۳۳
شکل ۹-۱ طرح شماتیک از نحوه ی عملکرد Fas در مسیر خارجی آپوپتوز.....	۳۵
شکل ۱۰-۱ طرح شماتیک مسیرهای داخلی و خارجی آپوپتوز . استرس سلولی پروتئین P۵۳ را فعال می‌کند.	۳۷
شکل ۱۱-۱ تأثیر ریزمحیط و ROS بر روی پتانسیل تمایزی BM- MSCs.....	۴۰
شکل ۱۲-۱ طرح شماتیک خلاصه ای از استراتژی های استفاده شده برای بهبود شرایط کاربرد MSC ها در پزشکی بازساختی و درمان	۴۸
شکل ۱۳-۱ خزانه ی عمده ی ترکیبات آهن دار در بدن یک مرد ۷۰ کیلویی و چرخه ی گردش آهن.....	۴۹
شکل ۱۴-۱ ساختار مولکول پروستتیک هم (Heme) و ارتباط آن با اشکال مختلف آهن Fe^{2+} و Fe^{3+}	۵۰
شکل ۱۵-۱ مسیر سنتز heme در سلول‌های یوکاریوتی هوازی.....	۵۱
شکل ۱۶-۱ تنظیم هورمونی جریان آهن از انتروسیت های دئودنوم و ماکروفاژهای سیستم رتیکولواندوتلیال توسط هپسیدین	۵۵
شکل ۱۷-۱ اهمیت آهن در شرایط پاتوفیزیولوژیک.....	۶۴
شکل ۱۸-۱ واکنش fenton و Haber-Weiss	۶۵
شکل ۱۹-۱ طرح شماتیک ارتباط LIP و ROS تولید شده توسط آن که نهایتاً به مرگ سلولی منجر می‌شود.	۶۶
شکل ۲۰-۱ طرح شماتیک و مقایسه ای اتصال حذف کننده های بایندنت و تریدنت و هگزادنت با اتم آهن	۶۷
شکل ۲۱-۱ طرح شماتیک تنظیم وابسته به اکسیژن و آهن پروتئین HIF.....	۷۰
شکل ۲۲-۱ طرح شماتیک از اثرات پروآپوپتوتیک یا آنتی آپوپتوتیک هیپوکسی در سلول.....	۷۲
شکل ۲۳-۱ تنظیم رونویسی Hamp توسط HIFs از طریق مسیر پیام رسانی BMP.....	۷۳
شکل ۱-۲ احیاء مولکول MTT و تولید فورمازان توسط آنزیم های میتوکندریایی.....	۸۲
شکل ۲-۲ نحوه واکنش آکریدین اورنج با مولکول تک رشته ای DNA و RNA	۸۴
شکل ۳-۲ ساختار مولکول اتیدیوم بروماید و نمایی شماتیک از واکنش آن با مولکول دو رشته ای DNA.....	۸۵
شکل ۴-۲ ساختار مولکولی DAPI و نمایی شماتیک از واکنش این مولکول با DNA دو رشته ای	۸۶
شکل ۵-۲ مراحل جداسازی استخوان های موش صحرایی.....	۸۸
شکل ۶-۲ مراحل استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش صحرایی.....	۸۹
شکل ۱-۳ مراحل گسترش BM-MSC های P۰ مشتق از مغز استخوان موش صحرایی در محیط کشت معمولی.....	۱۰۱
شکل ۲-۳ درصد بیان نشانگرهای سطحی CD۱۰۵, CD۹۰, CD۷۳, CD۴۴, CD۳۴, CD۴۵ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی.....	۱۰۳
شکل ۳-۳ تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده ی سلولی چربی.....	۱۰۵
شکل ۴-۳ مقایسه ی میانگین درصد حیات BM-MSC در گروه‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ سلولی در چهار غلظت مختلف H_2O_2	۱۰۶

- شکل ۳-۵ تأثیر غلظت‌های مختلف H_2O_2 بر روی میزان حیات BM-MSCs ۱۰۹
- شکل ۳-۶ نمودار تأثیر غلظت‌های مختلف DFO بر توانایی زنده ماندن BM-MSCs ۱۱۱
- شکل ۳-۷ مقایسه ی اثر غلظت‌های مختلف DFO بر روی مقاومت BM-MSCs در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 ۱۱۳
- شکل ۳-۸ بررسی مورفولوژیکی سلول‌های مقاوم شده در برابر استرس اکسیداتیو با تکنیک رنگ آمیزی AO/EB و DAPI ۱۱۶
- شکل ۳-۹ مقایسه ی کمی سلول‌های رنگ آمیزی شده با تکنیک AO/EB در مراحل مختلف آپوپتوز و نکروز ۱۱۷
- شکل ۳-۱۰ مقایسه ی کمی آپوپتوز در BM-MSCs گروه‌های مورد آزمایش با تکنیک رنگ آمیزی DAPI ۱۱۸
- شکل ۳-۱۱ مقایسه ی میزان بیان ۳ caspase در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل ۱۲۰

علايم اختصاري به كار رفته در متن

A ¹ /Bf ¹	The anti-apoptotic Bcl- ² family member
ACD	Anemia of chronic disease
ADLH	aldehyde dehydrogenase
Akt	Subfamily of serine/threonine kinases that contain SH ² (Src homology ² -like) domains.
ALAS	Aminolevulinic acid synthase.
AO/EB	Acridine orange/ Ethidium bromide
Apaf - ¹	Apoptotic protease activating factor ¹
APO ² ¹ /TRAIL	Apo ² ligand / TNF-related apoptosis-inducing ligand
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
Bad	Bcl- ² -associated death promoter
Bak	Bcl- ² homologous antagonist/killer
Bax	BCL ² Associated X Protein
Bcl ²	B-cell lymphoma ²
BH	Bcl- ² homology - Bcl- ² homology (BH) domains
BID	BH ³ interacting-domain death agonist,
BIK	Bcl- ² -interacting killer
BMF	Bcl ² modifying factor
BM-MSC	Bone Marrow - Mesenchymal Stem Cell
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Bok	Bcl- ² related ovarian killer
C/EBP α	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
caspase	cysteine-aspartic proteases
CD	Cluster of Differentiation
c-FLIP	Cellular FLICE (FADD-like IL- ¹ β -converting enzyme)-inhibitory protein
CFU	colony-forming unit
CO	Carbon monoxide
CO ₂	Carbon dioxide
CP	Ceruloplasmin
CSF	Cerebrospinal fluid
CVD	Cardiovascular disease
CXCL	C-X-C motif chemokine (Ligand)

CXCR	C-X-C Chemokine Receptor
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DcytB	Duodenal Cytochrome B
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DFO	Deferoxamine
DIABLO	direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low Pi
DISC	death-inducing signaling complex
DMEM-LG	Dulbecco's Modified Eagle Medium - Low Glucose
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMT ¹	Divalent Metal Transporter ¹
DNA	Deoxyribonucleic acid
DOX	Doxorubicin
DP	Doubling Population
DR	death receptor
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
ERFE	Erythroferrone
ESC	Embryonic Stem Cell
EPCs	Endothelial progenitor cells
EPO	Erythropoietin
ERFE	Erythroferrone
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas-associated via death domain
Fas	TNF Receptor Superfamily, Member ⁶
FasL	Fas Ligand
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
FLVCR ¹	Feline Leukemia Virus subgroup C Receptor ¹
Fpn	Ferroportin
FSC	Forward Scatter
Ft	Ferritin

FtH	Ferritin heavy chain
FtL	Ferritin light chain
GDF γ	Growth Differentiation Factor γ
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
H $_2$ O $_2$	Hydrogen peroxide
Hamp	Hepcidin Antimicrobial Peptide
HCl	Hydrogen chloride
Heph	Hephaestin
hESC	human Embryonic Stem Cell
HFE	Human hemochromatosis protein - a protein which in humans is encoded by the HFE gene
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HH	Hereditary hemochromatosis
HIF	Hypoxia-inducible factors
HJV	Hemojuvelin
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen - antigen D Related+D α
HO- γ	Heme Oxygenase - γ
HOX	A subset of homeotic genes are along the cranio-caudal (head-tail) axis
HrK	Activator of apoptosis harakiri - a protein that in humans is encoded by the HRK gene
HSC	Hematopoietic Stem Cell
HSC	Hematopoietic stem cell
Hsp γ	Heat Shock Protein γ
IC $_{50}$	The half maximal inhibitory concentration
ICAD	Inhibitor of caspase-activated DNase
IgG- FITC	ImmunoglobulinG - Fluorescein isothiocyanate
IgG- PE	ImmunoglobulinG - phycoerythrin
IL- γ	Interleukin γ
iPSC	Induced pluripotent stem cells
IRE	Iron Regulatory Element
IRIDA	Iron refractory iron deficiency anemia
IRP	Iron Regulatory Protein
KCl	Potassium chloride
KH $_2$ PO $_4$	Monopotassium phosphate

LDL	Low-density lipoprotein
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
Lin -	lineage-negative cells (lineage marker)
LIP	Labile Iron Pool
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MAP	Microtubule associated protein
Mcl- λ	Myeloid Cell Leukemia Sequence λ (BCL λ -Related)
MDR	Multi Drug Resistances
MMP- γ	Matrix MetalloProteinase γ
MNC	MonoNeuclear Cell
mRNA	Messenger RNA
MSC	Mesenchymal Stem Cell
MTT	γ -(ξ , ϕ -dimethylthiazol- γ -yl)- γ , ϕ -diphenyltetrazolium bromide
NaCl	Sodium chloride
NANOG	Homeobox protein NANOG - NANOG (pron. nanOg) is a transcription factor critically involved with self-renewal of undifferentiated embryonic stem cells. In humans, this protein is encoded by the NANOG gene
NaOH	Sodium hydroxide
NBIA	Neurodegeneration with brain iron accumulation
NF κ B	Nuclear Factor κ B
Nogo-A	Neurite outgrowth inhibitor
NOXA	Bcl- γ homology domain γ -only protein NOXA
Nrf γ	Nuclear Related Factor γ
NTBI	Non-transferrin bound iron
Oct	Octamer-binding transcription factor
Oct ξ	octamer-binding transcription factor ξ
OD	Optical Density
OG	oxoglutarate
p γ ϕ /CBP	p γ ϕ /CREB-binding protein - p γ ϕ /CBP coactivator family
PBS	Phosphate buffered saline - sourcebioscience.com
PCBP- λ	Poly-r-(c)-bonding protein - λ
Pen/Strep/AmpB	Penicillin / Streptomycin / Amphotericin B
PHD	prolyl hydroxylase domain
PTH/PTHrP	ParaThyroid Hormone/ParaThyroid Hormone-related Protein

PUMA	p ^u upregulated modulator of apoptosis
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
RBC	Red Blood Cell
REX ¹	Rex ¹ (Zfp- ⁴²) is a known marker of pluripotency, and is usually found in undifferentiated embryonic stem cells
RIP	Receptor-Interaction Protein
RNA	ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
SCD	Sickle cell anemia
SCL ^{11A}	solute carrier family ¹¹ member ¹ - DMT - ¹
SCL ^{4A}	solute carrier family ⁴ member ¹ - Ferroportin- ¹
SD	Serum deprivation
SDF ¹	stromal cell-derived factor ¹
Shh	Sonic hedgehog
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
SMAD	SMADs are intracellular proteins that transduce extracellular signals from transforming growth factor beta ligands to the nucleus
SOD	Super Oxide Dismutase
SOX	SRY (sex determining region Y)-box
SP	Side Population
SSC	Side Scatter
t-BID	Truncated p ¹⁹ BID
Tf	Transferrin
TfR ¹	Transferrin receptor ¹
TGF- β	Transforming growth factor beta
TMPRSS ¹	Transmembrane Protease, Serine ¹
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	TNF-receptor
TRADD	TNF- receptor associated DEATH domain
TRAF	TNF-Receptor Associated Factor
TRAIL- ¹	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAMP	Thrombospondin-related apical membrane protein
TWSG ¹	Twisted Gastrulation BMP Signaling Modulator ¹
UTR	untranslated region

VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel–Lindau tumor suppressor
Wnt	The Wnt signaling pathways are a group of signal transduction pathways

فصل اول:

کلیات پژوهش

۱-۱ سلول‌های بنیادی

بدن انسان از سه دسته سلول اصلی ساخته شده است.

سلول‌های زایا^۱ سلول‌های پیکری^۲ سلول‌های بنیادی^۳ سلول‌های زایا سلول‌های نادری هستند که در پستانداران این سلول‌ها اگرچه در حفظ حیات فرد تأثیر چندانی ندارند اما برای بقای گونه اهمیت فوق العاده ای دارند و در همان مراحل اولیه ی تکوین جنین از سلول‌های سوماتیک مشتق می‌شوند و تحت شرایط خاصی تکوین پیدا می‌کنند. در حقیقت این سلول‌ها حلقه ی اتصال نسل‌های متمادی اند. با وجودی که این سلول‌ها نیز از الگوهای کلی مشترکی همانند سایر سلول‌ها برای تکوین بهره می‌برند اما علاوه بر آنها الگوهای منحصر به فردی نیز برای تکوین سلول‌های زایا در مسیر تخصصی شدن آنها وجود دارد. برای مثال این سلول‌ها تنها سلول‌هایی از بدن هستند که می‌توانند علاوه بر تقسیم میتوز، متحمل تقسیم میوز نیز شده و گامت‌ها را به وجود آورند. این سلول‌ها در طی تکوین رویانی خود دچار برنامه ریزی مجدد^۴ شده و ژنوم آنها دستخوش تغییرات گسترده اپی ژنتیکی می‌شود (بهاروند، ۱۳۹۳).

سلول‌های پیکری سلول‌هایی هستند که تشکیل دهنده ی بافت‌ها و اندام‌های عملکردی و فیزیولوژیکی بدن می‌باشند. این سلول‌ها حاصل تقسیم میتوز سلول زیگوت می‌باشند و بر اساس تخصص و تمایزی که در طی تکوین جنین کسب می‌کنند به رده‌های مختلف سلولی تبدیل شده و بافت‌ها و اندام‌ها را به وجود می‌آورند (آلبرتس، ۱۳۸۵).

سلول‌های بنیادی بیانگر سلول‌های تمایز نیافته و اولیه ای با قابلیت بالا می‌باشند که در بسیاری از بافت‌های موجودات پرسلولی یافت می‌شوند. این سلول‌ها با توانایی خود نوسازی^۵ و تولید سلول‌های پیش ساز در این بافت‌ها علاوه بر حفظ خاصیت بنیادینگی می‌توانند به ترمیم بافت‌های آسیب دیده نیز پردازند. خاصیت خودنوسازی و همچنین قابلیت تمایز این سلول‌ها به رده‌های مختلف سلولی چشم اندازه‌های جدیدی را در مورد استفاده از این

^۱ . Germ Cells

^۲ . Somatic Cells

^۳ . Stem Cells

^۴ . Reprograming

^۵ . self-renewal